

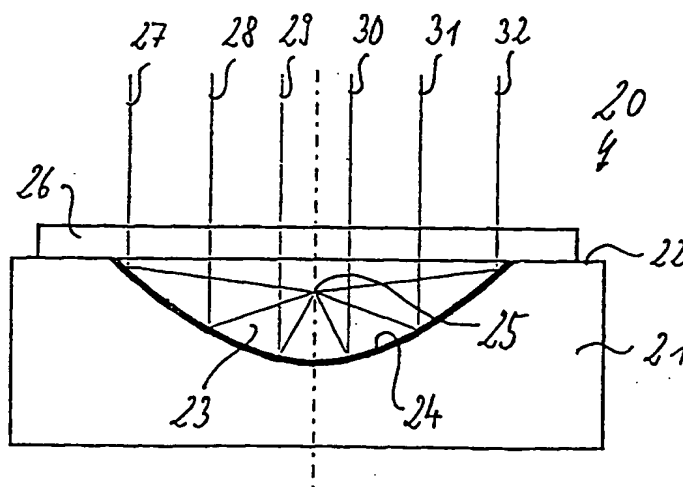
PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 21/03, 21/64, G01J 3/44</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/09393</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. Februar 1999 (25.02.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02307</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 11. August 1998 (11.08.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 35 119.0 13. August 1997 (13.08.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TEWES, Michael [DE/DE]; Bergheimerstrasse 34, D-69115 Heidelberg (DE). LAN- GOWSKI, Jörg [DE/DE]; Werderstrasse 72, D-69120 Hei- delberg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: CASTELL, Klaus usw.; Schillingsstrasse 335, D-52355 Düren (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>

(54) Title: **FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY PROCESS AND DEVICE, IN PARTICULAR FOR POLYCHROMATIC FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR FLUORESZENZKORRELATIONSSPEKTROSKOPIE, INSBESONDERE ZUR MEHRFARBEN-FLUORESZENZKORRELATIONSSPEKTROSKOPIE**



(57) Abstract

According to the disclosed process, light rays enter the transparent medium in a parallel direction and are deflected inside the transparent medium towards a focus, thus avoiding the use of refractive optics. The disclosed focusing optics enable light rays of different wavelengths to be bundled onto a point within the sample, considerably simplifying the design and adjustment of a polychromatic fluorescence correlation spectroscopy device.

BEST AVAILABLE COPY

(57) Zusammenfassung

Bei dem Verfahren fallen die Lichtstrahlen parallel in das transparente Medium ein und werden innerhalb des transparenten Mediums zu einem Fokus hin abgelenkt. Dadurch wird die Verwendung refraktiver Optik vermieden. Die fokussierende erfindungsgemäße Optik erlaubt die Bündelung von Lichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen auf einen Punkt innerhalb der Probe. Dadurch wird der Aufbau und die Justierung einer Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Vorrichtung deutlich vereinfacht.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss den PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

- 1 -

Verfahren und Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie,
insbesondere zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung
5 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarben-
Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, bei dem Lichtstrahlen in einem
transparenten Medium fokussiert werden.

Bei der Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) werden
molekulare Wechselwirkungen untersucht, indem man zwei Reaktionspartner mit
10 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und sie in einem flüssigen,
transparenten Medium frei diffundieren läßt. Die Reaktionspartner erzeugen bei
der Diffusion durch den Fokus Fluktuationen der Fluoreszenzintensität, die mit
einer konfokalen Optik detektiert werden können. Detektiert man überwiegend
korrelierte Intensitätsfluktuationen zwischen den Emmissionswellenlängen der
15 beiden Fluorophore, so deutet dies auf eine Komplexbildung zwischen den beiden
Partnern hin.

Wegen der unterschiedlichen Anregungswellenlängen der Fluorophore müssen
zwei Laserwellenlängen verwendet werden, die auf ein identisches, möglichst
kleines Volumen in der Probe fokussiert werden. Hierzu werden in der Regel
20 Mikroskopobjektive mit hoher numerischer Apertur, d. h. großem
Öffnungswinkel verwendet, um einerseits einen möglichst kleinen Fokus zu
erzielen und andererseits einen möglichst großen Teil des emittierten Lichts

- 2 -

einzusammeln und auf dem Detektor abzubilden.

Bei den verfügbaren Objektiven mit hoher numerischer Apertur ist es jedoch nicht möglich, die Brennpunkte für die unterschiedlichen Wellenlängen vollständig zur Deckung zu bringen. Obwohl die Objektive hoch optimiert sind, ist dies aufgrund der chromatischen Fehler nicht für alle Wellenlängen gleichzeitig möglich. Die bekannten Objektive sind daher für die Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie nicht brauchbar.

Ein weiterer Nachteil der verfügbaren Objektive liegt darin, daß ein optimaler, beugungsbegrenzter Fokus nur gewährleistet ist, wenn der Brechungsindex des Immersionsmediums und der Probelösung dem Wert entsprechen, für den das Objektiv optimiert wurde. Da die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sehr empfindlich auf Änderungen des Fokusvolumens reagiert, kann eine Änderung des Brechungsindex die Ergebnisse stark beeinträchtigen. Ursachen für die Änderungen des Brechungsindex sind zum Beispiel Temperaturänderung der Probe oder im Puffer gelöste Salze und somit Parameter, die standardmäßig in biochemischen Experimenten variiert werden. Dieses Problem tritt auch schon bei der Einfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie auf.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zu entwickeln, die die beschriebenen Nachteile nicht aufweisen.

Diese Aufgabe wird verfahrensmäßig durch ein gattungsgemäßes Verfahren gelöst, bei dem die Lichtstrahlen annähernd senkrecht in das transparente Medium einfallen und erst innerhalb des transparenten Mediums zum Fokus hin

- 3 -

abgelenkt werden.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß die bekannten Fehler auf der Verwendung von refraktiver Optik basieren. Einfallwinkel und Ausfallwinkel an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien sind über das Snellius-Gesetz durch deren Brechungsindizes miteinander verknüpft. Ändern sich die Brechungsindizes aufgrund von Dispersion, d.h. einer Änderung des Brechungsindex mit der Wellenlänge, oder durch Verwendung anderer Puffer, so ändert sich auch der Strahlengang und damit das Fokusvolumen. Diese Problematik betrifft jeden Strahlengang mit Ausnahme der auf die Grenzfläche senkrecht einfallenden Lichtstrahlen. Nur der auf die Grenzfläche senkrecht einstrahlende Lichtstrahl passiert die Grenzfläche unabhängig von den Brechungsindizes ohne Ablenkung. Diese Erkenntnis führte dazu, daß zur Lösung der Aufgabe in der fokussierenden Anordnung nur reflektive Optik verwendet wurde, und daß sämtliche Lichtstrahlen die Grenzflächen zwischen unterschiedlichen optischen Medien nur senkrecht durchdringen.

Insofern definiert der Begriff "annähernd senkrecht" sich aus der gewünschten Genauigkeit bei der Messung. Im Rahmen einer gewünschten Messgenauigkeit sind Abweichungen möglich.

Das beschriebene Verfahren erlaubt somit eine einfache Optimierung des verwendeten Objektivs und ermöglicht es, Laserstrahlen mit unterschiedlichen Wellenlängen auf ein identisches, möglichst beugungsbegrenztes Volumen innerhalb der Probe zu fokussieren.

- 4 -

Eine verhältnismäßig einfache Umsetzung der Erfindung läßt sich realisieren, wenn die Lichtstrahlen innerhalb des transparenten Mediums zum Fokus hin reflektiert werden.

- 5 Vorrichtungsmäßig wird die Aufgabe mit einer gattungsgemäßen Vorrichtung gelöst, bei der das Probegefäß einen fokussierenden, verspiegelten Boden aufweist, wobei der Fokus innerhalb des Probegefäßes liegt. Hierbei kann der Boden derart ausgestaltet sein, daß im Wesentlichen parallel zueinander in das Probegefäß einfallende Lichtstrahlen im Wesentlichen auf den Fokus fokussiert werden.
- 10 Diese Vorrichtung erlaubt es, das Probegefäß als fokussierendes Element zu verwenden. Die in das Probegefäß parallel einfallenden Lichtstrahlen werden durch dessen Boden auf einen Punkt fokussiert. Da dieser Punkt innerhalb des Probegefäßes liegt, entsteht keine weitere Ablenkung der parallel einfallenden Lichtstrahlen an den Grenzflächen zwischen zwei Medien. Die Lichtstrahlen
- 15 müssen nur einmal in die Probe gelangen und da hier parallel und senkrecht einfallende Lichtstrahlen verwendet werden, werden diese beim Durchdringen des Deckglases oder des Übergangs zwischen Deckglas und Probeflüssigkeit nicht abgelenkt. Während der Ablenkung innerhalb der transparenten Probe müssen keine Grenzflächen zwischen unterschiedlichen Medien überwunden werden.
- 20 Vorteilhaft ist es, wenn das Probegefäß schalenförmig ist und der Fokus innerhalb der Schale liegt. Eine optimale Bodenform wird dadurch erreicht, daß der Boden parabolisch oder leicht elliptisch geformt ist.

- 5 -

Um ein gutes Meßergebnis zu erzielen wird vorgeschlagen, daß der Boden auf einen Bruchteil der verwendeten Wellenlänge genau gefertigt ist. Die hohe, mit der Vorrichtung erzielbare Präzision fordert auch eine genaue Ausbildung der verspiegelten Bodenfläche.

- 5 Um eine langfristige Haltbarkeit der Verspiegelung zu gewährleisten, wird weiterhin vorgeschlagen, daß der Boden mit einer gegenüber üblichen Pufferlösungen resistenten Schicht verspiegelt ist.

- 10 Als transparentes Medium kann jedes Material dienen, in dem eine Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie durchgeführt werden kann. Insbesondere kann dieses ein transparentes Fluid bzw. eine transparente Flüssigkeit oder ein Gel sein.

Ein Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung in Gegenüberstellung zu einer bekannten Vorrichtung ist in der Zeichnung dargestellt und wird im folgenden näher erläutert.

- 15 Es zeigt,

Figur 1 eine schematische Darstellung einer bekannten Vorrichtung zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und

Figur 2 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.

- 6 -

Die in Figur 1 gezeigte Vorrichtung 1 aus dem Stand der Technik besteht aus einer Küvette 2, die auf einem Deckglas 3 steht und in der sich die Probe 4 in Pufferlösung befindet. Unterhalb des Deckglases 3 befindet sich die letzte Linse 5 eines Objektives und zwischen dieser letzten Linse 5 und dem Deckglas 3 befindet sich Immersionsflüssigkeit 6.

Parallele Lichtstrahlen 7, 8, 9, 10 gelangen somit durch das Objektiv 5 in die Immersionsflüssigkeit 6 und gehen weiter durch das Deckglas 3 in die in der Küvette 2 befindliche Pufferlösung 4, wo sie sich in einem Fokus 11 bzw. 12 treffen.

10 Die unterschiedlichen Wellenlängen der Lichtstrahlen 7, 8 bzw. 9, 10 führen dazu, daß die Strahlen an jeder Grenzfläche zwischen zwei Medien unterschiedlich abgelenkt werden und sich somit in verschiedenen Foki 11 bzw. 12 treffen. Um so größer der Abstand 13 zwischen dem Fokus 11 und dem Fokus 12 ist, um so größer ist die Beeinträchtigung der Messung.

15 Die beschriebene Vorrichtung zeigt, daß die Lichtstrahlen 7, 8, 9, 10 von Lasern mit unterschiedlichen Laserwellenlängen mehrere Grenzflächen passieren müssen, bis sie sich in einem der Wellenlänge des jeweiligen Lichtstrahls entsprechenden Fokus 11 bzw. 12 treffen. Diese Übergänge führen zu einer starken Beeinträchtigung der Messung.

20 Die in Figur 2 gezeigte Vorrichtung 20 besteht aus einem Block 21 mit einer planen Oberfläche 22 in die eine Vertiefung 23 als Probegefäß eingearbeitet ist. Dieses Probegefäß hat im Querschnitt die Form einer Parabel und eine

- 7 -

verspiegelte Bodenfläche 24, die als Parabolspiegel wirkt. Dieser Parabolspiegel ist so ausgelegt, daß sich der Fokus 25 von parallel einfallenden Lichtstrahlen innerhalb der Vertiefung 23 befindet.

5 Oberhalb der Vertiefung 23 ist auf die plane Oberfläche 22 des Blocks 21 ein Deckglas 26 aufgelegt, das die mit Probe in Pufferlösung angefüllte Vertiefung 23 abdeckt.

10 Um die Fokussierung im Punkt 25 zu optimieren, ist der Boden 24 auf einen Bruchteil der Wellenlängen der verwendeten Lichtstrahlen genau gefertigt und das spiegelnde Material ist so auf die Pufferlösungen abgestimmt, daß eine Veränderung des Materials durch die Pufferlösungen oder die Probe unterbleibt.

15 Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung 20 wird zunächst die Probe mit einer Pufferlösung in die Vertiefung des Blocks 21 gegeben. Die vollständig gefüllte Vertiefung 23 wird anschließend mit dem Deckglas 26 abgedeckt. Dies hat zur Folge, daß parallel einfallende Lichtstrahlen 27, 28, 29, 30, 31, 32 senkrecht die Oberfläche des Deckglases durchdringen, in die in der Vertiefung 23 angeordnete Probe eindringen und durch die Probe hindurch bis auf die Bodenfläche 24 gelangen. Da der Lichtstrahl bis hier jede Grenzfläche zwischen zwei Medien (Luft/Deckglas) und (Deckglas/Probe) senkrecht schneidet, wird er nicht abgelenkt. Erst nach Auftreffen auf die verspiegelte Bodenfläche 24 innerhalb der Probeflüssigkeit werden die Lichtstrahlen 27 bis 32 zum Fokus 25 hin abgelenkt. Da diese Reflektion an der Bodenfläche 24 unabhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ist, treffen sich alle Lichtstrahlen 27 bis 32 im Fokus 25, auch wenn die Lichtstrahlen 27 bis 32

- 8 -

verschiedene Wellenlängen aufweisen.

Die Vorrichtung hat somit den Vorteil, daß der parabolisch oder leicht elliptisch geschliffene Spiegel als fokussierendes Element und gleichzeitig als Aufnahme für die Probe dient und somit prinzipiell alle Abbildungsfehler eliminiert werden.

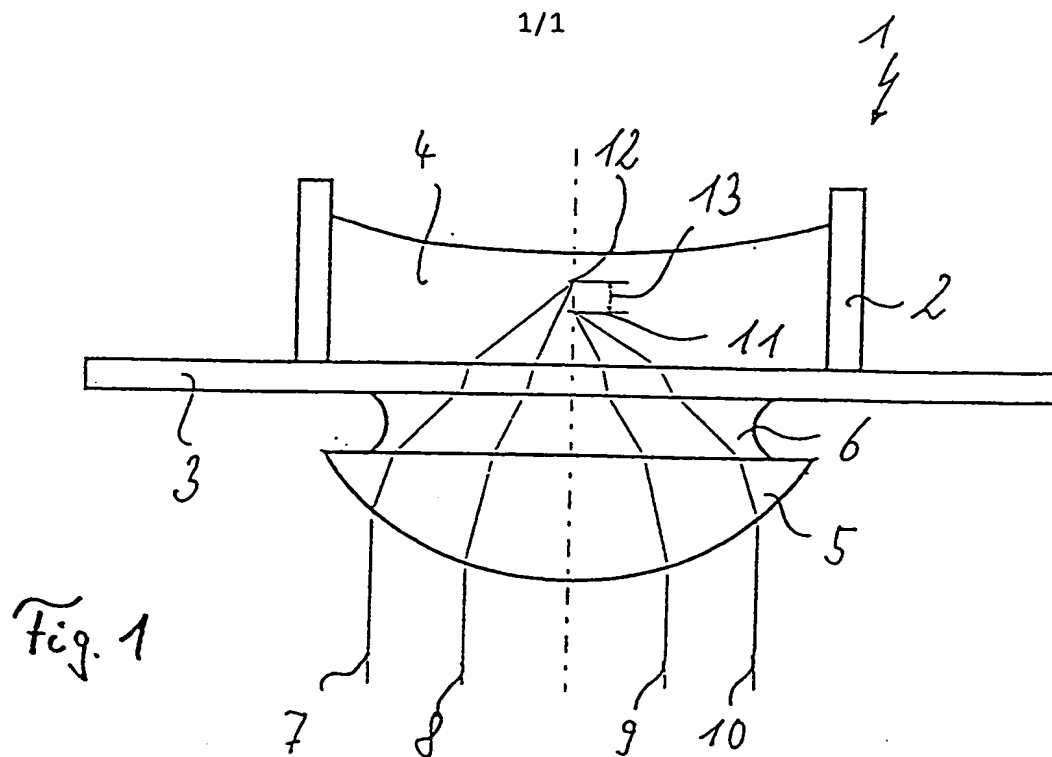
Patentansprüche:

1. Verfahren zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bei dem Lichtstrahlen (27 bis 32) in einem transparenten Medium fokussiert werden, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Lichtstrahlen (27 bis 32) annähernd senkrecht in das transparente Medium einfallen und erst innerhalb des transparenten Mediums zum Fokus (25) hin abgelenkt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 2, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Lichtstrahlen (27 bis 32) innerhalb des transparenten Mediums zum Fokus (25) hin reflektiert werden.
3. Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, die ein Probegefäß (23) aufweist, *dadurch gekennzeichnet, daß* das Probegefäß (23) einen fokussierenden, verspiegelten Boden (24) aufweist, wobei der Fokus (25) innerhalb des Probegefäßes (23) liegt.
4. Vorrichtung nach Anspruch 3, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Boden (24) derart ausgestaltet ist, daß im Wesentlichen parallel zueinander in das Probegefäß (23) einfallende Lichtstrahlen (27 bis 32) im Wesentlichen auf den Fokus (25) fokussiert werden.
5. Vorrichtung nach Anspruch 3 oder 4, *dadurch gekennzeichnet, daß* das Probegefäß (23) schalenförmig ist und der Fokus (25) innerhalb der

- 10 -

Schalenform liegt.

- 5
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Boden (24) parabolisch oder leicht elliptisch geformt ist.
 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 6, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Boden (24) auf einen Bruchteil der verwendeten Wellenlänge der Lichtstrahlen (27 bis 32) genau gefertigt ist.
 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 7, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Boden (24) mit einer gegen übliche Pufferlösungen resistenten Schicht verspiegelt ist.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/02307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N21/03 G01N21/64 G01J3/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N G01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 199 686 A (BRUNSTING ALBERT ET AL) 22 April 1980 see abstract see column 4, line 3 - line 20 see column 8, line 67 - column 9, line 18 see figure 6	1-6
Y	SCHWILLE P ET AL: "DUAL-COLOR FLUORESCENCE CROSS-CORRELATION SPECTROSCOPY FOR MULTICOMPONENT DIFFUSIONAL ANALYSIS IN SOLUTION" BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 72, no. 4, April 1997, pages 1878-1886, XP002059917 see page 1879, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 2 see figure 3	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 January 1999

Date of mailing of the international search report

14/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Verdoodt, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/DE 98/02307

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 106 662 A (DYNATECH LAB) 25 April 1984 see abstract see page 25, line 21 - page 26, line 6 see figure 10 -----	1,3
A	WO 94 16313 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ;RIGLER RUDOLF (DE); EIGEN MANFRED (DE); HE) 21 July 1994 see figure 4 see page 39, last paragraph - page 40, paragraph 2 -----	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/02307

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4199686 A	22-04-1980	CA 1113763 A	08-12-1981
		DE 2930593 A	28-02-1980
		FR 2432710 A	29-02-1980
		GB 2027193 A, B	13-02-1980
		JP 55022189 A	16-02-1980
EP 0106662 A	25-04-1984	AU 564381 B	13-08-1987
		AU 1929583 A	19-04-1984
		DE 3378545 A	29-12-1988
		JP 2078438 C	09-08-1996
		JP 3040818 B	20-06-1991
		JP 59132335 A	30-07-1984
		US 4725388 A	16-02-1988
WO 9416313 A	21-07-1994	DE 4301005 A	21-07-1994
		AT 164943 T	15-04-1998
		AU 5884394 A	15-08-1994
		DE 59405644 D	14-05-1998
		EP 0679251 A	02-11-1995
		ES 2116578 T	16-07-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02307

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N21/03 G01N21/64 G01J3/44

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N G01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 4 199 686 A (BRUNSTING ALBERT ET AL) 22. April 1980 siehe Zusammenfassung siehe Spalte 4, Zeile 3 - Zeile 20 siehe Spalte 8, Zeile 67 - Spalte 9, Zeile 18 siehe Abbildung 6	1-6
Y	SCHWILLE P ET AL: "DUAL-COLOR FLUORESCENCE CROSS-CORRELATION SPECTROSCOPY FOR MULTICOMPONENT DIFFUSIONAL ANALYSIS IN SOLUTION" BIOPHYSICAL JOURNAL, Bd. 72, Nr. 4, April 1997, Seiten 1878-1886, XP002059917 siehe Seite 1879, rechte Spalte, Absatz 1 - Absatz 2 siehe Abbildung 3	1-6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/01/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Verdoodt, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02307

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 106 662 A (DYNATECH LAB) 25. April 1984 siehe Zusammenfassung siehe Seite 25, Zeile 21 - Seite 26, Zeile 6 siehe Abbildung 10 -----	1,3
A	WO 94 16313 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ;RIGLER RUDOLF (DE); EIGEN MANFRED (DE); HE) 21. Juli 1994 siehe Abbildung 4 siehe Seite 39, letzter Absatz - Seite 40, Absatz 2. -----	3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02307

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4199686 A	22-04-1980	CA 1113763 A	08-12-1981
		DE 2930593 A	28-02-1980
		FR 2432710 A	29-02-1980
		GB 2027193 A,B	13-02-1980
		JP 55022189 A	16-02-1980
EP 0106662 A	25-04-1984	AU 564381 B	13-08-1987
		AU 1929583 A	19-04-1984
		DE 3378545 A	29-12-1988
		JP 2078438 C	09-08-1996
		JP 3040818 B	20-06-1991
		JP 59132335 A	30-07-1984
		US 4725388 A	16-02-1988
WO 9416313 A	21-07-1994	DE 4301005 A	21-07-1994
		AT 164943 T	15-04-1998
		AU 5884394 A	15-08-1994
		DE 59405644 D	14-05-1998
		EP 0679251 A	02-11-1995
		ES 2116578 T	16-07-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.